低温冷藏提高家蚕滞育卵 NAD 含量和胞质苹果酸脱氢酶活性

王启龙，万华星，姚金美，司马杨虎，赵林川*

（苏州大学基础医学与生物科学院，江苏苏州 215123）

摘要：为了调查 5℃低温处理是否改变家蚕 *Bombyx mori* 卵滞育 NAD 代谢，本研究利用 HPLC 和分光光度法测定了经 25℃和 5℃分别处理的滞育卵中 NADH 含量、NAD^+ 含量、乳酸脱氢酶(LDH)活性和胞质苹果酸脱氢酶(cMDH)活性。结果表明：5℃处理的 NAD(NADH + NAD^+)含量和 cMDH 活性分别增加了 106% 和 53%，并且显著高于 25℃处理($P < 0.01$)；但是两种处理的 NADH/NAD^+ 比值和 LDH 活性没有显著差异($P > 0.05$)。据此推测，5℃低温处理加强了家蚕滞育卵 NAD^+ 合成和再生能力。

关键词：家蚕；滞育解除；辅酶 NAD；乳酸脱氢酶；胞质苹果酸脱氢酶

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)09-1031-06

Chilling enhances the NAD levels and cytosolic malate dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*

WANG Qi-Long, WAN Hua-Xing, YAO Jin-Mei, SIMA Yang-Hu, ZHAO Lin-Chuan* (School of Biological and Basic Medicine Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: To investigate whether chilling at 5℃ changes the metabolism of NAD in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, the levels of NADH and NAD^+ along with the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and cytosolic malate dehydrogenase (cMDH) in diapause eggs incubated at 25℃ and 5℃, respectively, were determined using HPLC and spectrophotometric methods. NAD (NADH + NAD^+) levels and the cMDH activity in diapause eggs incubated at 5℃ increased by 106% and 53%, respectively, which were significantly higher than those in diapause eggs incubated at 25℃ ($P < 0.01$). However, no significant difference in the NADH/NAD^+ ratio and the LDH activity was observed between the incubation treatments at 25℃ and 5℃ ($P > 0.05$). It is so inferred that the ability for NAD^+ synthesis and regeneration in *Bombyx* diapause eggs is enhanced by chilling.

Key words: *Bombyx mori*; diapause termination; nicotinamide adenine dinucleotide; lactate dehydrogenase; cytosolic malate dehydrogenase

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)包括还原型(NADH)和氧化型(NAD^+)两种类型。通过糖酵解和三羧酸循环，NAD^+被还原为 NADH，NADH 经过呼吸电子传递链的传递，最终被 O_2 氧化为 NAD^+，同时生成 ATP 和 H_2O。可见，NAD(NADH + NAD^+)含量和 NADH/NAD^+比值的变化与呼吸耗氧量关系密切。NAD^+再生是上述过程能否持续不断地顺利进行的前提条件之一。除了通过呼吸电子传递链再生 NAD^+途径外，乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和胞质苹果酸脱氢酶(cytosolic malate dehydrogenase, cMDH)也能够催化 NAD^+ 再生。LDH 是糖酵解途径中的一个重要酶，催化丙酮酸被 NADH 还原生成乳酸，同时完成 NAD^+ 的再生。cMDH 是苹果酸-天冬氨酸穿梭机制中的关键酶，催化草酰乙酸被 NADH 还原为苹果酸，同时完成 NAD^+的再生(Ying, 2008)。

家蚕 *Bombyx mori* 是典型的卵滞育昆虫。即时浸酸可以阻止家蚕滞育性卵的滞育发动，低温冷藏能够解除其滞育状态(Yamashita, 1996；黄君霆, 2003)。此前我们的研究表明，即时浸酸在提高呼吸耗氧量的同时，显著提高了 NAD 含量，但是未显

基金项目：国家自然科学基金项目(31272501)

作者简介：王启龙，男，1989 年 7 月生，山东烟台人，硕士研究生，主要从事自由基生物学研究，E-mail：wqlong0605@126.com

*通讯作者 Corresponding author, E-mail：sdzlc2008@163.com

收稿日期 Received：2012-08-15；接受日期 Accepted：2012-09-18

著改变 NADH/NAD^+ 比值(姚金美等, 2012)。为了调查低温处理在解除家蚕卵滞育的同时是否也显著改变其 NAD 代谢, 我们从家蚕滞育性卵产下后 48 h 开始分别进行 25℃和 5℃处理, 并且利用 HPLC 和分光光度法测定了 NADH 含量、NAD^+ 含量、LDH 活性和 cMDH 活性的变化。结果发现低温处理显著提高了 NAD 含量和 cMDH 活性。

1 材料与方法

1.1 家蚕品种

二化性、单系家蚕原种大造(Dazao), 由苏州大学蚕桑研究所提供。

1.2 家蚕滞育性卵的获得及处理

家蚕卵在温度 25℃、自然光照下催青, 孵化后用常规桑叶饲养, 幼虫期、蛹期和成虫期都置于 25℃、光周期 12L:12D 中, 以生产滞育性家蚕卵(Morita *et al.*, 2003)。滞育性家蚕卵保存于 25℃中, 在产下后 48 h 取出部分蚕卵, 经过 15℃、2 h 过渡后, 转入 5℃中进行低温处理, 以解除滞育状态, 共处理 90 d。分别在低温处理后 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 和 90 d 取蚕卵样品 5 g, 样品在液氮中速冻后置于 -70℃保存, 分别用于 NADH 含量、NAD^+ 含量、LDH 活性和 cMDH 活性测定。所有测定重复 3 次。

1.3 家蚕卵 NADH 和 NAD^+ 含量测定

25℃和 5℃处理的家蚕卵中 NADH 和 NAD^+ 提取和含量测定采用 NAD 含量测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司), 测定方法按照试剂盒说明进行。HPLC 分析条件同姚金美等(2012), 使用的高效液相色谱仪和色谱柱的型号分别为 Waters 1525 和 Agilent ZORBAX Sb-aq (250 mm × 4.6 mm)。

1.4 家蚕卵 LDH 和 cMDH 活性测定

25℃和 5℃处理的家蚕卵中 LDH 和 cMDH 提取和活性测定分别采用 LDH 活性测定试剂盒和 cMDH 活性测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司), 测定方法按照试剂盒说明进行。在 37℃下测定 LDH 活性, 活性单位为 nmol /mg pro · min。在 25℃下测定 cMDH 活性, 活性单位定义为 nmol /mg pro · min。

1.5 数据统计与分析

采用 ANOVA 和 Student's Newman-Keuls post hoc test (SPSS Inc., USA) 比较 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NADH, NAD^+ 和 NAD 含量以及 NADH/NAD^+ 比值、LDH 活性和 cMDH 活性的差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 两种温度处理对家蚕滞育卵 NADH 含量的影响

处理期间, 25℃处理的家蚕滞育卵 NADH 含量无显著变化, 5℃处理的 NADH 含量增加了 117%; 后者 NADH 含量在处理后 10 - 30 d 期间显著高于前者($P < 0.05$), 处理后 40 - 90 d 期间极显著高于前者($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 226% (图 1)。

2.2 两种温度处理对家蚕滞育卵 NAD^+ 含量的影响

处理后 0 - 10 d, 25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵 NAD^+ 含量分别下降了 30% 和 25%; 处理后 10 - 90 d, 25℃处理的 NAD^+ 含量无显著变化, 5℃处理的 NAD^+ 含量升高了 73%; 后者 NAD^+ 含量在处理后 10 - 30 d 期间显著高于前者($P < 0.05$), 处理后 40 - 90 d 期间极显著高于前者($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 200% (图 2)。

2.3 两种温度处理对家蚕滞育卵 NAD 含量的影响

处理期间, 25℃处理的家蚕滞育卵 NAD 含量下降了 8%, 5℃处理的 NAD 含量增加了 106%; 后者 NAD 含量在处理后 10 - 30 d 期间显著高于前者($P < 0.05$), 处理后 40 - 90 d 期间极显著高于前者($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 224% (图 3)。

2.4 两种温度处理对家蚕滞育卵 NADH/NAD^+ 比值的影响

处理后 0 - 10 d, 25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵 NADH/NAD^+ 比值分别升高了 43% 和 60%; 处理后 10 - 90 d, 两者 NADH/NAD^+ 比值处于波动中, 后者高于前者, 但是差异不显著(图 4)。

2.5 两种温度处理对家蚕滞育卵 LDH 活性的影响

处理后 0 - 10 d, 25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵 LDH 活性分别下降了 51% 和 47%; 处理后 10 - 90 d, 两者 LDH 活性都略有升高, 但是不存在显著差异(图 5)。

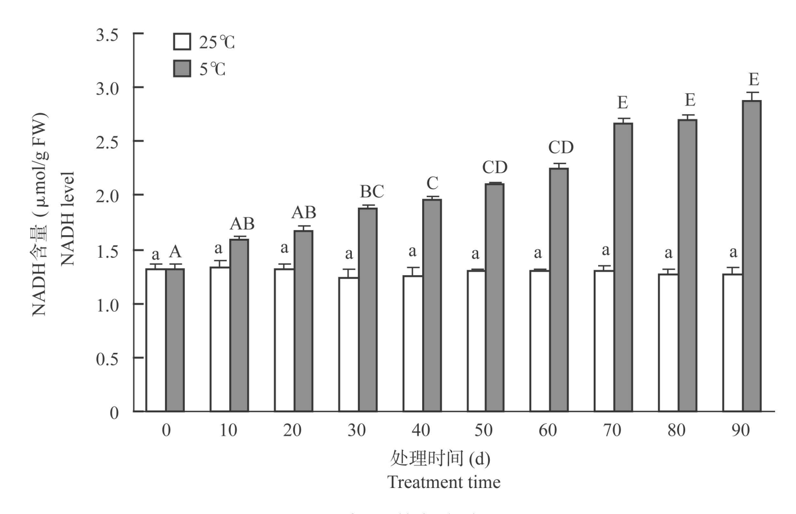


图 1　25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NADH 含量的变化

Fig. 1　Changes in NADH level in the 25℃- and 5℃-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

柱上不同大、小写字母分别表示 5℃和 25℃下不同处理时间在 0.05 水平上存在显著差异（*t* 检验）；下图同。Different captital and small letters above bars indicate significant difference among different treatment time at 5℃ and 25℃, respectively (*t* test). The same for the following figures.

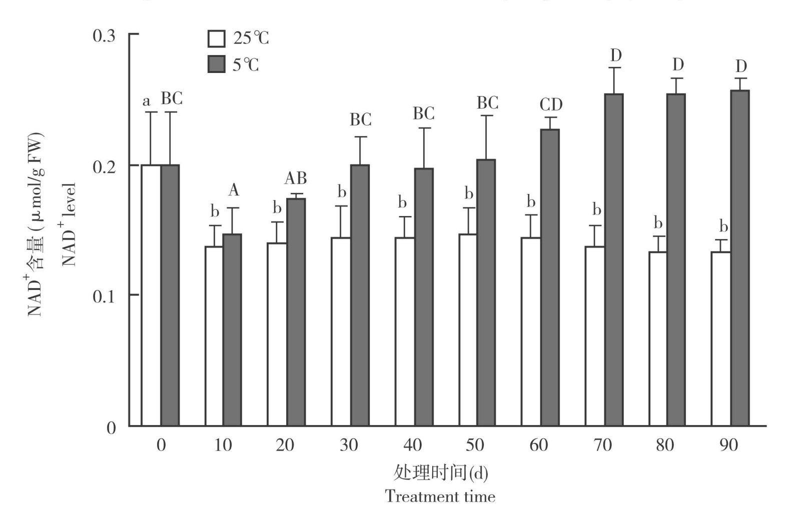


图 2　25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NAD^+ 含量的变化

Fig. 2　Changes in NAD^+ level in the 25℃- and 5℃-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

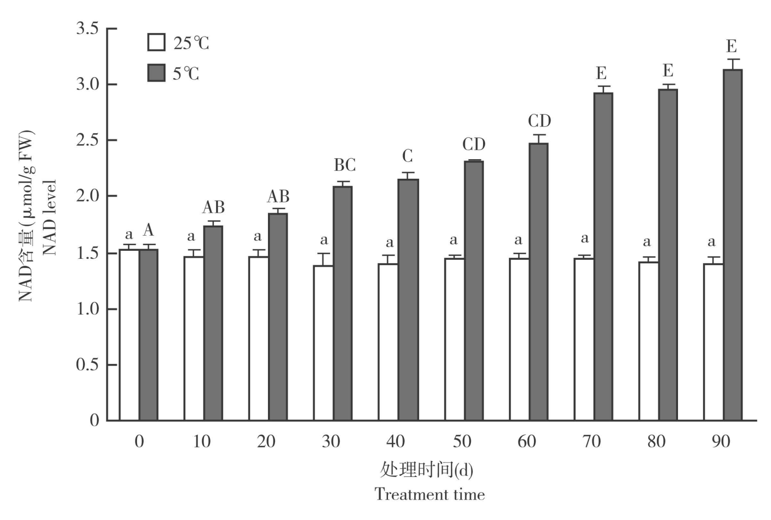


图 3　25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NAD 含量的变化

Fig. 3　Changes in NAD level in the 25℃- and 5℃-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

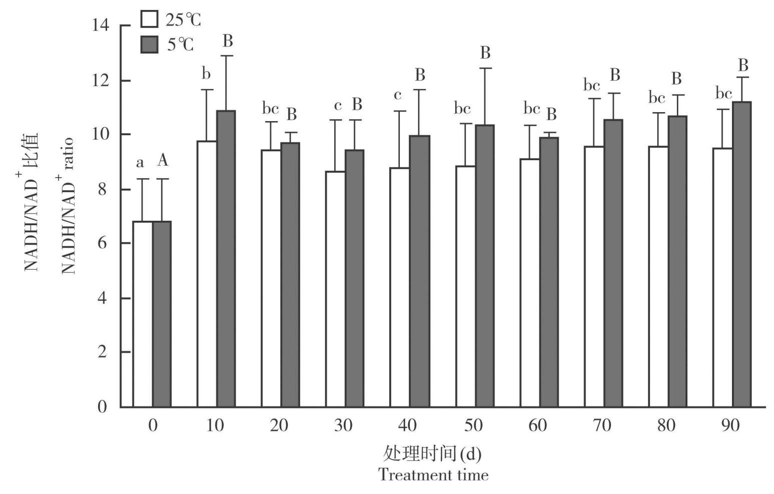


图 4 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NADH/NAD⁺比值的变化

Fig. 4 Changes in NADH/NAD⁺ ratio in the 25℃- and 5℃-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

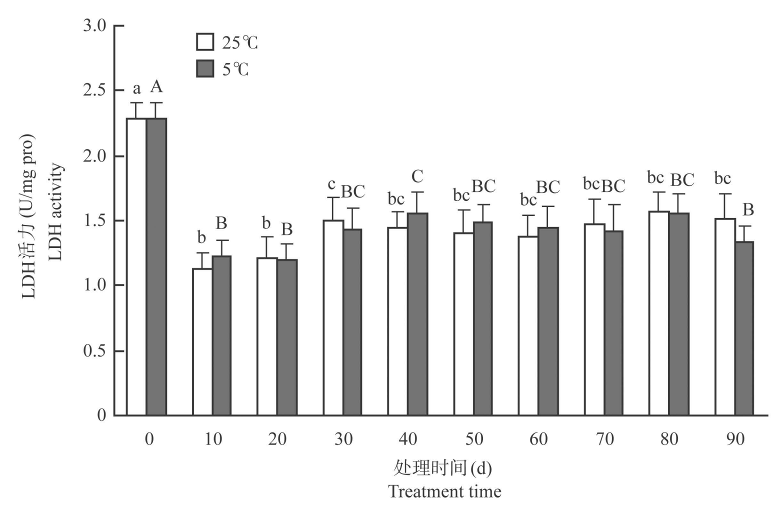


图 5 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 LDH 活性的变化

Fig. 5 Changes in LDH activity in the 25℃- and 5℃-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

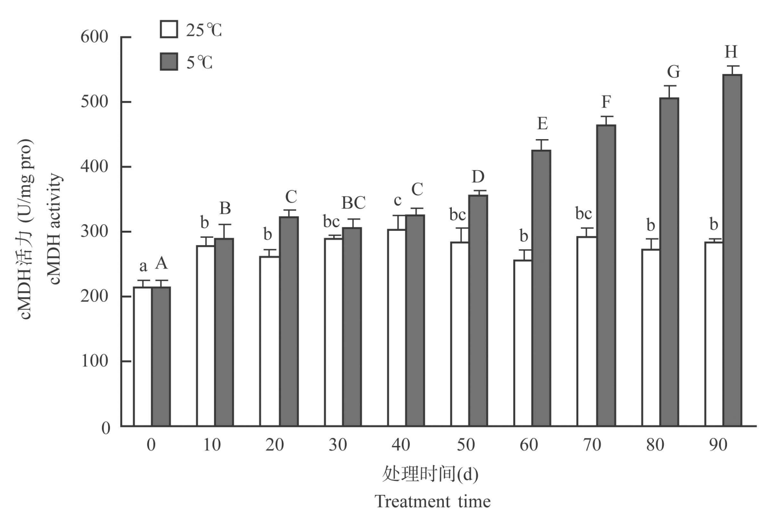


图 6 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 cMDH 活性的变化

Fig. 6 Changes in cMDH activity in the 25℃- and 5℃-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

2.6　两种温度处理对家蚕滞育卵 cMDH 活性的影响

处理期间，25℃处理的家蚕滞育卵 cMDH 活性在 40 d 形成峰值，5℃处理的 cMDH 活性升高了 53%；后者 cMDH 活性在处理后 10－40 d 期间与前者不存在显著差异，处理 50 d 时显著高于前者（$P<0.05$），处理后 60－90 d 期间极显著高于前者（$P<0.01$），处理 90 d 时后者相当于前者的 192%（图 6）。

3　讨论

本研究结果表明，25℃处理在维持滞育状态的同时，家蚕滞育卵的 NAD 含量略有下降；相反，5℃处理在解除滞育状态的同时，极显著地提高了 NAD 含量。NAD 含量主要受到 NAD^+ 合成和降解平衡的影响（Ying，2008）。可见，与即时浸酸一样，5℃处理的家蚕滞育卵中 NAD^+ 合成大于 NAD^+ 降解。此外，NAD 激酶催化 NAD^+ 磷酸化生成氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，$NADP^+$），NADP 磷酸酶催化相反的反应（Kawai and Murata，2008）。因此，NAD 含量还受到 NAD^+/$NADP^+$ 相互转化状况的影响。5℃处理还显著提高了家蚕滞育卵的 NADP（NADPH + $NADP^+$）含量和 NAD 激酶活性（另文发表）。据此可以进一步推测，5℃处理通过加强 NAD^+ 合成来提高家蚕滞育卵 NAD 含量。

25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵呼吸耗氧量不存在显著差异（Yaginuma and Yamashita，1999）。可见，5℃处理未显著改变家蚕滞育卵中通过呼吸电子传递链氧化再生 NAD^+ 的能力。25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵 LDH 活性不存在显著差异，但是 5℃处理的 cMDH 活性从处理 50 d 开始显著高于 25℃处理。该结果表明，5℃处理 50 d 以上能够通过提高 cMDH 活性来加强家蚕滞育卵中 NAD^+ 再生能力。

与 NAD 含量不同，NADH/NAD^+ 比值主要受到 NADH 氧化和 NAD^+ 还原平衡状况的影响（Ying，2008）。本研究表明，25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵 NADH/NAD^+ 比值不存在显著差异。NAD-山梨醇脱氢酶（NAD dependent sorbitol dehydrogenase，NAD-SDH）催化山梨醇转化为糖原时，NAD^+ 被还原生成 NADH。在产下后 2 d 对家蚕滞育卵进行 5℃处理，山梨醇脱氢酶（sorbitol dehydrogenase，SDH）活性大约从处理 40 d 开始显著升高（Niimi *et al.*，1993）。这意味着 5℃处理的家蚕滞育卵中 NAD^+ 从处理 40 d 开始被还原为 NADH。如上所述，5℃处理的 cMDH 活性从处理 50 d 开始显著高于 25℃处理。可见，5℃处理通过同时提高 SDH 和 cMDH 活性来达成 NADH 氧化和 NAD^+ 还原平衡，从而导致 25℃和 5℃处理的家蚕滞育卵 NADH/NAD^+ 比值不存在显著差异。

在 5℃中，家蚕滞育卵的呼吸耗氧量一直保持在极低水平。如果在冷藏不同时间后转入 25℃中，其呼吸耗氧量的变化表现出两种情况：（1）冷藏时间少于 50 d，呼吸耗氧量升高程度有限；（2）冷藏时间超过 60 d，呼吸耗氧量显著升高（Yaginuma and Yamashita，1999）。本研究结果表明，在 5℃处理过程中家蚕滞育卵 NAD^+ 合成能力持续增强，NAD^+ 再生能力直到处理 50 d 以后才开始显著增强。据此可以推测，5℃处理 50 d 以内，虽然 NAD^+ 合成能力显著增加，但是 NAD^+ 再生能力较低，不足以维持高强度的糖酵解-三羧酸循环，因此家蚕滞育卵呼吸耗氧量在 5℃和 25℃中都较低；5℃处理 50 d 以上，NAD^+ 合成能力进一步增加，同时 NAD^+ 再生能力开始显著增强，能够维持高强度的糖酵解-三羧酸循环，5℃低温抑制了呼吸作用，导致呼吸耗氧量仍然维持于极低水平，但是 NAD^+ 合成和再生能力增强为转入 25℃后呼吸耗氧量迅速升高奠定了基础。

近年来，低温处理解除家蚕滞育分子机制的研究取得了很大进展（Moribe *et al.*，2001；Lin *et al.*，2009；侯宜胜等，2010；孟刚等，2010；Sima *et al.*，2011；王丽等，2011；姚金美等，2012），但是关于低温处理对家蚕滞育卵 NAD 代谢的研究还未见报道。本研究结果表明，5℃处理显著增强了家蚕滞育卵 NAD^+ 合成和再生能力。鉴于 NAD 是能量代谢、线粒体功能、钙稳态、氧化胁迫和基因表达等不同生物学过程的重要调控因子，而且在家蚕滞育发动、即时浸酸阻止滞育发动和低温处理解除滞育过程中 NAD^+ 合成和再生能力都发生了显著变化（Ying，2008；姚金美等，2012），今后有必要进一步对家蚕滞育卵 NAD 代谢及其功能做深入研究。

参考文献（References）

Hou YS, Wang L, Yao JM, Zhao LC, 2010. Variations of hydrogen peroxide and catalase gene expression in *Bombyx mori* diapause eggs

and HCl-treated eggs during cold storage. *Acta Sericol. Sin.*, 36 (4): 697 - 701. [侯宜胜, 王丽, 姚金美, 赵林川, 2010. 冷藏期间家蚕滞育卵和即时浸酸卵的 H_2O_2 含量及过氧化氢酶基因表达的变化. 蚕业科学, 36(4): 697 - 701]

Huang JT, 2003. Studies on the molecular mechanism of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sin.*, 29: 1 - 6. [黄君霆, 2003. 家蚕滞育分子机制的研究. 蚕业科学, 29: 1 - 6]

Kawai S, Murata K, 2008. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(4): 919 - 930.

Lin JL, Lin PL, Gu SH, 2009. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3β in relation to diapause processing in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 55(6): 593 - 598.

Meng G, Sima YH, Zhao LC, 2010. Variation of glutathione S-transferase in eggs of bivoltine strain (*Bombyx mori*) during diapause process. *Acta Sericol. Sin.*, 36(1): 170 - 174. [孟刚, 司马杨虎, 赵林川, 2010. 二化性家蚕滞育过程中谷胱甘肽 S-转移酶活性的变化. 蚕业科学, 36(1): 170 - 174]

Moribe Y, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2001. Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domain (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs. *Eur. J. Biochem.*, 268(12): 3432 - 3442.

Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 1993. A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 213: 1125 - 1131.

Sima YH, Yao JM, Hou YS, Wang L, Zhao LC, 2011. Variations of hydrogen peroxide and catalase gene expression in *Bombyx* eggs during diapause initiation and termination. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(2): 72 - 80.

Wang L, Hou YS, Yao JM, Sima YH, Zhao LC, 2011. Effect of low temperature on the ratio of GSH and GSSG in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sin.*, 37(1): 52 - 56. [王丽, 侯宜胜, 姚金美, 司马杨虎, 赵林川, 2011. 低温处理对家蚕滞育卵还原型与氧化型谷胱甘肽比值的影响. 蚕业科学, 37(1): 52 - 56]

Yaginuma T, Yamashita O, 1999. Oxygen consumption in relation to sorbitol utilization at the termination of diapause in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 45: 621 - 627.

Yamashita O, 1996. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.*, 42: 669 - 679.

Yao JM, Wan HX, Sima YH, Zhao LC, 2012. Instant hydrochloric acid soaking enhances NAD(H) and NADP(H) levels in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 55(1): 24 - 28. [姚金美, 万华星, 司马杨虎, 赵林川, 2012. 即时浸酸显著提高滞育性家蚕卵辅酶Ⅰ和Ⅱ含量. 昆虫学报, 55(1): 24 - 28]

Ying WH, 2008. NAD^+/NADH and $NADP^+$/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.*, 10(2): 179 - 206.

(责任编辑: 赵利辉)